

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 06331894
PUBLICATION DATE : 02-12-94

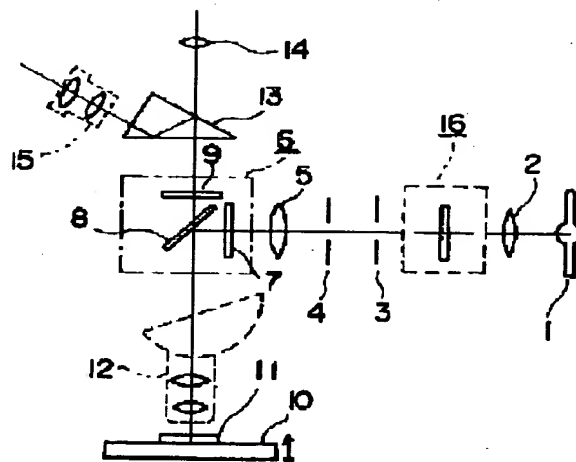
APPLICATION DATE : 24-05-93
APPLICATION NUMBER : 05121083

APPLICANT : OLYMPUS OPTICAL CO LTD;

INVENTOR : NAGANO TAKASHI;

INT.CL : G02B 21/00

TITLE : VERTICAL ILLUMINATING
FLUORESCENT MICROSCOPE



ABSTRACT : PURPOSE: To obtain the best observed picture and the best photographed picture by individually adjusting respective quantities of light of two or more kinds of fluorescent images emitted from a specimen.

CONSTITUTION: A light quantity adjusting device 16 which individually adjusts the quantity of light of each narrow-band exciting light wavelength is inserted in the optical path from a vertical illuminating light source 1 to a dichroic mirror 8. The light quantity adjusting device 16 consists of plural separating dichroic mirrors 33a to 33c which separate the incident light into light of respective band exciting light wavelength, plural light quantity adjusting filters 34a to 34c which adjust quantities of light separated by separating dichroic mirrors, and plural condensing elements 33a' to 33c' which condense each ray of light, whose quantities of light are adjusted by the respective light quantity adjusting filters, to one luminous flux. Further, the light quantity adjusting device 16 consists of plural unit light quantity adjusting units 42a to 42c which one separating dichroic mirror, one light quantity adjusting use filter, and one condensing element are built in.

COPYRIGHT: (C) JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-331894

(43) 公開日 平成6年(1994)12月2日

(51) Int.Cl.⁵

G 0 2 B 21/00

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

7625-2K

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平5-121083

(22) 出願日 平成5年(1993)5月24日

(71) 出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72) 発明者 清水 敬之

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ

ンパス光学工業株式会社内

(72) 発明者 長野 隆

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ

ンパス光学工業株式会社内

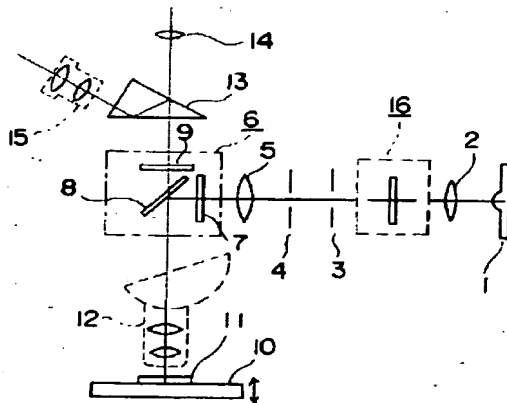
(74) 代理人 弁理上 鈴江 武彦

(54) 【発明の名称】 落射蛍光顕微鏡

(57) 【要約】

【目的】 落射蛍光顕微鏡において、標本から発する2種以上の蛍光像の各光量を個別に調整可能にして、最良の観察画像及び最良の撮影画像を得る。

【構成】 落射照明用光源1からダイクロイックミラー8までの光路に、各狭帯域励起光波長の光の光量をそれぞれ個別に調整する光量調整装置16を介挿する。また、光量調整装置16を、入射光を各帯域励起光波長の光に分離する複数の分離用ダイクロイックミラー33a~33cと、各分離用ダイクロイックミラーにて分離された各光の光量を調整する複数の光量調整用フィルター34a~34cと、各光量調整用フィルターで光量が調整された各光を1本の光束に集光するための複数の集光素子33a'~33c'とで構成する。さらに、光量調整装置16を、1個の分離用ダイクロイックミラーと1個の光量調整用フィルター及び1個の集光素子が組込まれた複数の単位光量調整ユニット42a~42cで構成している。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 落射照明用光源から出射された光束から複数の狭帯域励起光波長の光を抽出する励起フィルターと、この励起フィルターにて抽出された複数の狭帯域励起光波長の光を反射させて標本に照射し、当該標本から発せられる複数の種類の蛍光を透過するダイクロイックミラーと、このダイクロイックミラーからの透過光に含まれる不要波長成分を吸収する吸収フィルターと、この吸収フィルターを透過した蛍光像を観察する観察光学系とを有する落射蛍光顕微鏡において、前記落射照明用光源から前記ダイクロイックミラーまでの光路に介挿され、前記各狭帯域励起光波長の光の光量をそれぞれ個別に調整する光量調整装置を備えたことを特徴とする落射蛍光顕微鏡。

【請求項2】 前記光量調整装置は、入射光を前記各帯域励起光波長の光に分離する複数の分離用ダイクロイックミラーと、この各分離用ダイクロイックミラーにて分離された各光の光量を調整する複数の光量調整用フィルターと、この各光量調整用フィルターで光量が調整された各光を1本の光束に集光するための複数の集光素子とを備えたことを特徴とする請求項1記載の落射蛍光顕微鏡。

【請求項3】 前記光量調整装置は、1個の分離用ダイクロイックミラーと1個の光量調整用フィルター及び1個の集光素子が組込まれた複数の単位光量調整ユニットを有し、かつこの各単位光量調整ユニットは任意に着脱及び増設可能に構成されたことを特徴とする請求項2記載の落射蛍光顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、医学、生物学等の分野において生物組織などの状態を観察するときに利用される落射蛍光顕微鏡に係わり、特に標本から発する2種以上の蛍光像の各光量を個別に調整可能にした落射蛍光顕微鏡に関する。

【0002】

【従来の技術】 落射蛍光顕微鏡は、主として医学および生物学の分野において生物組織細胞上で蛍光標識を施した蛋白や遺伝子などを検出する目的で広く使用されている。特に、近年では、微弱な蛍光しか発しない物質であっても、複数の蛍光標識による多重染色によって、他の物質との位置相互関係を調べる目的で多用されるようになってきた。

【0003】 このような落射蛍光顕微鏡を用いて多重染色蛍光標本を観察する場合、それぞれ単一の蛍光色素を観察するための蛍光フィルターセット（励起フィルター、ダイクロイックミラー、吸収フィルター）を各単一の蛍光色素毎に切換えることにより1つずつの蛍光色素を観察していた。そして、それぞれの蛍光色素の位置相互関係を調べるためにはそれぞれの蛍光像について写真

やビデオメモリに多重記録して表示しなくてはならない。

【0004】 しかし、このような落射蛍光顕微鏡においては、蛍光フィルターセットの切換操作が複雑であり、切換操作に一定以上の作業時間が必要であり、観察作業能率が低下する。また、例えば褪色の速い蛍光色素や時間をパラメータとした蛍光色素の位置相互関係の検出には利用できない問題が生じる。

【0005】 さらに、蛍光フィルターセットの切換えに伴い、ダイクロイックミラーや吸収フィルター等の部品精度によって観察光学系の芯ずれが発生し、蛍光像より検出される位置相互関係に誤差が発生する問題がある。

【0006】 このような問題を解消するために、最近、図9及び図10に示す複数の狭帯域励起光波長の光を同時に標本に照射する落射蛍光顕微鏡が提唱されている。図9において、水銀ランプ等の光源1から投射された光束はコレクタレンズ2で集光されたのち、開口絞り3及び視野絞り4で絞られた後、レンズ5を介して蛍光フィルターセット6に入射される。

【0007】 この蛍光フィルターセット6は、図10に示すように、3種の蛍光色素A、B、Cを効率的に励起する3つの高透過率の狭帯域励起光波長 λ_{EA} 、 λ_{EB} 、 λ_{EC} を持つ励起フィルター7と、これら3つの波長 λ_{EA} 、 λ_{EB} 、 λ_{EC} との間、および波長 λ_{EC} よりも長い波長領域の3つの高透過率領域を有するダイクロイックミラー8と、不要波長成分を除去する吸収フィルター9とで構成されている。

【0008】 蛍光フィルターセット6へ入射された光束は励起フィルター7によって、3つの狭帯域励起光波長 λ_{EA} 、 λ_{EB} 、 λ_{EC} の光のみが抽出されて次のダイクロイックミラー8へ入射される。ダイクロイックミラー8は図10に示す波長透過特性を有しているため、狭帯域励起光波長 λ_{EA} 、 λ_{EB} 、 λ_{EC} の各光はこのダイクロイックミラー8で反射されてステージ10上の標本11に照射される。

【0009】 標本11は予め3種類の蛍光色素によって染色されているので、この標本11からは前記各波長 λ_{EA} 、 λ_{EB} 、 λ_{EC} に対して、各波長 λ_{EA} 、 λ_{EB} 、 λ_{EC} から長波長側にシフトした波長を有する3種類の蛍光を発する。標本11から発せられた蛍光は、対物レンズ12を介してダイクロイックミラー8へ入射する。ダイクロイックミラー8は前記各波長 λ_{EA} 、 λ_{EB} 、 λ_{EC} から長波長側にシフトした波長を有する各蛍光を透過させて、次の吸収フィルター9へ入射させる。各蛍光はこの吸収フィルター9によって不要な波長域の光が除去されて、蛍光像の波長のみがビームスプリッター13にて撮影系レンズ14、及び結像レンズと接眼レンズとからなる観察光学系15へ導かれる。

【0010】 このように、複数の波長透過特性を有した励起フィルター7とダイクロイックミラー8と吸収フィ

ルター9とを組合せることにより、3種の蛍光色素A、B、Cを同時に観察することが可能である。

【0011】また、2種の蛍光色素のみを同時観察する落射蛍光顕微鏡や、上記高透過率領域を更に連ねて4種及びそれ以上の種類の蛍光色素の同時観察を行う落射蛍光顕微鏡も同様な構成で実現できる。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】上述したような構成の蛍光フィルターセット6を用いることによって、観察光学系の芯ずれや位相相互関係の誤差をなくすることができるが、蛍光色素毎の蛍光強度の違いや蛍光の褪色速度の違いなどが生じているとき、これら複数種の蛍光強度を所望の明るさにすることが困難である。

【0013】その結果、観察或いは写真等に記録される各蛍光像はどれか1つが暗すぎたり、または明るすぎたり、また明るさが不揃いになる問題がある。なお、前述した3種類の蛍光色素の蛍光強度を調節する手段として、例えば観察光路中の吸収フィルター9の特性を変更するか、又は観察光路に補助フィルターを挿入して、標本11から発する蛍光を部分的にカットする蛍光カット手段が考えられる。また、照明光路中に分光選択吸収を示さない中性濃度のNDフィルターを挿入するか又は開口絞り3を調節するなどして照明光の強度を調節する光強度調節手段も考えられる。

【0014】しかし、前者の蛍光カット手段では、カットされた部分の蛍光を励起した励起光が無駄となり、それだけ蛍光の利用効率が悪くなり、標本11に余分な疲労（損傷）を与えることになって好ましくない。一方、後者の光強度調節手段では、3波長の励起光強度をそれぞれ独立に調節できないので、3種類の蛍光の強度比を30 変えることができない。

【0015】本発明はこのような事情に鑑みてなされたもので、蛍光フィルターセットを構成する各フィルターを交換することなく多重染色蛍光標本の観察を可能とし、しかも、各励起毎の蛍光強度を簡単な操作で適宜可変して観察又は撮影しやすい蛍光像を得ることができ、操作性及び観察、撮影精度を向上できる落射蛍光顕微鏡を提供することを目的とする。

【0016】

【課題を解決するための手段】上記課題を解消するために本発明は、落射照明用光源から出射された光束から複数の狭帯域励起光波長の光を抽出する励起フィルターと、この励起フィルターにて抽出された複数の狭帯域励起光波長の光を反射させて標本に照射し、標本から発せられる複数種類の蛍光を透過するダイクロイックミラーと、このダイクロイックミラーからの透過光に含まれる不要波長成分を吸収する吸収フィルターと、吸収フィルターを透過した蛍光像を観察する観察光学系とを有する落射蛍光顕微鏡において、落射照明用光源からダイクロイックミラーまでの光路に、各狭帯域励起光波長の光の

10

20

30

40

50

光量をそれぞれ個別に調整する光量調整装置を介挿している。

【0017】また別の発明においては、上記構成の落射蛍光顕微鏡の光量調整装置を、入射光を各帯域励起光波長の光に分離する複数の分離用ダイクロイックミラーと、各分離用ダイクロイックミラーにて分離された各光の光量を調整する複数の光量調整用フィルターと、各光量調整用フィルターで光量が調整された各光を1本の光束に集光するための複数の集光素子とで構成している。

【0018】さらに別の発明においては、上述した光量調整装置を、1個の分離用ダイクロイックミラーと1個の光量調整用フィルター及び1個の集光素子が組込まれた複数の単位光量調整ユニットで構成し、かつこの各単位光量調整ユニットを任意に着脱及び増設可能にしている。

【0019】

【作用】このように構成された落射蛍光顕微鏡においては、落射照明用光源からダイクロイックミラーまでの光路に、各狭帯域励起光波長の光の光量をそれぞれ個別に調整する光量調整装置が介挿されている。

【0020】すなわち、落射照明用光源から出射された光束から励起フィルターによって複数の狭帯域励起光波長の光が抽出されて、この抽出された各狭帯域励起光波長の光がダイクロイックミラーにて反射されて標本に入射される。そして、このダイクロイックミラーにて反射されて標本に入射される各狭帯域励起光波長の光が、光量調整装置によって個別に調整可能である。

【0021】したがって、たとえ、蛍光色素毎の蛍光強度の違いや蛍光の褪色速度の違い等が生じていたとしても、標本に入射される各光の光量を調整することによって、各蛍光像の明るさを均一にでき、各蛍光像を観察又は撮影しやすくてきる。

【0022】また、標本に対する入射光の光量が調整対象となるので、標本に過大な光量が照射されて、この標本から発する蛍光を後からフィルター等を用いて減光する事態が生じることはないので、過大照射に起因する標本の劣化を防止できる。

【0023】また別の発明においては、光量調整装置が各狭帯域励起光波長の光をそれぞれ分離するための複数の分離用ダイクロイックミラーと分離された各光の光量を調整する複数の光量調整用フィルターと光量が調整された各光を1本の光束に集光するための複数の集光素子とで構成されている。したがって、調整対象とする蛍光像に対応する光の光量調整用フィルターを操作すればよい。

【0024】さらに別の発明においては、光量調整装置が1個の分離用ダイクロイックミラーと1個の光量調整用フィルター及び1個の集光素子が組込まれた複数の単位光量調整ユニットで構成されている。さらに、各単位光量調整ユニットを任意に着脱及び増設可能にしてい

る。このように構成することによって、標本から発する蛍光像の数が増加したり減少した場合においても、光量調整装置全体を交換することなく、不必要な単位光量調整ユニットを取外したり、不足する単位光量調整ユニットを増設すればよい。

【0025】

【実施例】以下本発明の一実施例を図面を用いて説明する。図1は実施例の落射蛍光顕微鏡の光学系を示す構成図である。図9に示す従来の落射蛍光顕微鏡と同一部分には同一符号が付してある。したがって、重複する部分

の詳細説明を省略する。
【0026】落射照明光源としての水銀ランプ等の光源1から投射された光束はコレクタレンズ2で集光されたのち、光量調整装置16へ入射される。光量調整装置16にて光量が調整された光束は開口絞り3及び視野絞り4で絞られた後、レンズ5を介して蛍光フィルターセット6へ入射される。

【0027】この蛍光フィルターセット6は、図10で説明したように、3種の蛍光色素A、B、Cを効率的に励起する3つの高透過率の狭帯域励起光波長 λ_{EA} 、 λ_{EB} 、 λ_{EC} を持つ励起フィルター7と、これら3つの波長 λ_{EA} 、 λ_{EB} 、 λ_{EC} との間、および波長 λ_{EC} よりも長い波長領域の3つの高透過率領域を有するダイクロイックミラー8と、不要波長成分を除去する吸収フィルター9とで構成されている。

【0028】蛍光フィルターユニット6へ入射された光束は励起フィルター7によって、3つの狭帯域励起光波長 λ_{EA} 、 λ_{EB} 、 λ_{EC} の光のみが抽出されて次のダイクロイックミラー8へ入射される。ダイクロイックミラー8は図10に示す波長透過特性を有しているため、狭帯域励起光波長 λ_{EA} 、 λ_{EB} 、 λ_{EC} の各光はこのダイクロイックミラー8で反射されて上下動可能なステージ10上の標本11に照射される。

【0029】標本11は予め3種類の蛍光色素によって染色されているので、この標本11からは前記各波長 λ_{EA} 、 λ_{EB} 、 λ_{EC} に対して、各波長 λ_{EA} 、 λ_{EB} 、 λ_{EC} から長波長側にシフトした波長を有する3種類の蛍光を発する。標本11から発せられた蛍光は、対物レンズ12を介してダイクロイックミラー8へ入射する。ダイクロイックミラー8は前記各波長 λ_{EA} 、 λ_{EB} 、 λ_{EC} から長波長側にシフトした波長を有する各蛍光を透過させて、次の吸収フィルター9へ入射させる。各蛍光はこの吸収フィルター9によって不要な波長域の光が除去されて、蛍光像の波長のみがビームスプリッター13にて撮影系レンズ14、及び結像レンズと接眼レンズとからなる観察光学系15へ導かれる。

【0030】図2は前記光量調整装置16の光学系を示す構成図である。コンデンサレンズ2、開口絞り3、視野絞り4、レンズ5、蛍光フィルターセット6の光軸36上に、コリメータレンズ31、2個の全反射ミラー3

2、32、集光レンズ35が配設されている。なお、コリメータレンズ31と集光レンズ35の間は光源1に対して平行光となっている。

【0031】全反射ミラー32の反射光軸上に3個の分離用ダイクロイックミラー33a、33b、33cが配設されている。同様に、全反射ミラー32の入射光軸上に3個の集光素子としての集光用ダイクロイックミラー33a'、33b'、33c'が配設されている。各ダイクロイックミラー33a~33a'相互間、33b~33b'相互間、33c~33c'相互間にそれぞれ光量調整フィルターとしての干渉フィルター34a、34b、34cが介挿されている。

【0032】前記各ダイクロイックミラー33a、33a'は、図5に示すように、色素Aに対応する狭帯域励起光波長 λ_{EA} の光より長波長側の光を透過する透過特性を有する。したがって、狭帯域励起光波長 λ_{EA} の光は反射される。また、前記各ダイクロイックミラー33b、33b'は、色素Bに対応する狭帯域励起光波長 λ_{EB} の光より長波長側の光を透過する透過特性を有する。さらに、前記各ダイクロイックミラー33c、33c'は、色素Cに対応する狭帯域励起光波長 λ_{EC} の光より長波長側の光を透過する透過波長特性を有する。

【0033】図3は図2に示した光量調整装置16の外観図である。顕微鏡本体フレーム41内には、図2に示す光軸上のコリメータレンズ31、2個の全反射ミラー32、32、集光レンズ35が収納されている。そして、顕微鏡本体フレーム41におけるこの各光学部材が収納された外面に3個の直方体形状を有する単位光量調整ユニット42a、42b、42cが積層状に取付けられている。

【0034】顕微鏡本体フレーム41に取付けられた単位光量調整ユニット42a内には、図2に示す分離用ダイクロイックミラー33a、干渉フィルター34a、集光用ダイクロイックミラー33a'が収納されている。また、単位光量調整ユニット42b内には分離用ダイクロイックミラー33b、干渉フィルター34b、集光用ダイクロイックミラー33b'が収納されている。さらに、単位光量調整ユニット42c内には分離用ダイクロイックミラー33c、干渉フィルター34c、集光用ダイクロイックミラー33c'が収納されている。

【0035】単位光量調整ユニット42a、42b、42c内に収納された各干渉フィルター34a~34cは図示するように、光路中に光軸と垂直な軸を中心に回転可能に保持するための筒状フィルター枠43a~43cに支持されている。そして、この筒状フィルター枠43a~43cは操作ツマミ45a~45cによって回動される。この各操作ツマミ45a~45cは貫通孔44a~44cを介して各単位光量調整ユニット42a、42b、42cの上面に露出している。

【0036】また、各単位光量調整ユニット42a、4

2 b, 4 2 c の各前面及び後面には各分離用ダイクロイックミラー 3 3 a ~ 3 3 c を透過した光、及び、各集光用ダイクロイックミラー 3 3 a' ~ 3 3 c' へ入射する光りが通過する貫通孔 4 8 a, 4 8 b が穿設されている。なお、最も外側の単位光量調整ユニット 4 2 c の前面の使用しなし貫通孔 4 8 a, 4 8 b は図示しないキャップ等で塞がれている。

【0037】そして、各単位光量調整ユニット 4 2 a, 4 2 b, 4 2 c 相互間は固定金具 4 6 を介して固定ビス 4 7 で固定されている。第 4 図は各単位光量調整ユニット 4 2 b ~ 4 2 c の内部構成を示す断面図である。

【0038】単位光量調整ユニット 4 2 c のフレーム 5 1 c には、前記筒状フィルター枠 4 3 c を光軸と垂直な軸を持って回転可能に保持するための嵌合部が形成されている。この嵌合部内には、前記筒状フィルター枠 4 3 c を押すように動作可能な球 5 2、この球 5 2 を押すためのコイルバネ 5 3、このコイルバネ 5 3 を支持するばね受け 5 4 がねじ固定されている。

【0039】また、前記分離用ダイクロイックミラー 3 3 c はフィルター枠 5 5 にて保持されている。さらに、このフィルター枠 5 5 は前記フレーム 5 1 c の下部に設けられた取付部 5 6 に着脱可能に保持されている。同様に、前記集光用ダイクロイックミラー 3 3 c' はフィルター枠 5 5' にて保持されている。さらに、このフィルター枠 5 5' は前記フレーム 5 1 c の下部に設けられた取付部 5 6' に着脱可能に保持されている。

【0040】また、フレーム 5 1 c, 5 1 b の側面には、単位光量調整ユニット 4 2 c, 4 2 b 相互間を固定する場合に前記金具 4 6 及び固定ビス 4 7 を取付けるためのビス穴 5 7, 5 8 が刻設されている。さらに、フレーム 5 1 c の後面には、隣接する単位光量調整ユニット 4 2 b に自らの単位光量調整ユニット 4 2 c を積層するために、隣の貫通孔 4 8 a, 4 8 b に挿入されるフランジ部 5 9 a, 5 9 b が形成されている。

【0041】よって、各単位光量調整ユニット 4 2 c ~ 4 3 c の上面に露出している各操作ツマミ 4 5 a ~ 4 5 c を観察者が手動で回転させたり、他の電氣的又は機械的手段により回転することによって、干渉フィルター 3 4 a ~ 3 4 c が回転され、かつ、コイルばね 5 3 の押圧力を受けて前記球 5 2 が押圧力を与えて筒状フィルター枠 4 3、つまり干渉フィルター 3 4 a ~ 3 4 c は任意の回転位置で固定される。

【0042】このような構成の光量調整装置 1 6 において、コレクターレンズ 2 を介して入射した光束はコレクターレンズ 3 1 で平行光に変換されて、全反射ミラー 3 2 で全反射されて、各分離用ダイクロイックミラー 3 3 a, 3 3 b, 3 3 c に導かれる。各分離用ダイクロイックミラー 3 3 a, 3 3 b, 3 3 c において、図 5 から理解できるように、各色素 A, B, C に対応する各狭帯域励起光波長 λ_{EA} , λ_{EB} , λ_{EC} の各光のみが反射されて

それぞれの干渉フィルター 3 4 a, 3 4 b, 3 4 c へ入射される。

【0043】各干渉フィルター 3 4 a, 3 4 b, 3 4 c は、図 6 (a) (b) に示すように、透過率の波長特性が、光軸に対する傾斜角度に対応してシフトする特性を有する。

【0044】具体的には、この干渉フィルター 3 4 a, 3 4 b, 3 4 c を光軸に対して垂直な方向（傾き 0° ）に挿入したとき図 6 (a) に示すように各狭帯域励起光波長 λ_{EA} , λ_{EB} , λ_{EC} を中心とする透過波長特性を有する。一方、干渉フィルター 3 4 a, 3 4 b, 3 4 c を光軸に垂直な方向の軸に対して 45° だけ傾けて挿入したとき図 6 (b) のような各透過波長特性を得ることができる。

【0045】一般に、干渉フィルター 3 4 a ~ 3 4 c の干渉条件は、最大透過率波長を λ 、誘電体の光学的な厚さ（誘電体の境界で生じる位相差も光路長に換算して含ませる）を t 、境界による反射角を ϕ としたとき、次のような関係式で表すことができる。

$$2t \cdot \cos \phi = m\lambda$$

ここで、次数 m を一定とし、かつ、干渉条件を一定としたとき、波長 λ は $\cos \phi$ に比例する。この角度 ϕ は反射角であるが、スネルの法則により入射角と共役なので同等と見なせる。このことは、入射角を大きくしていけば、 $\cos \phi$ が減少していき、同時に波長 λ も減少していき、よって透過波長特性における最大透過率が得られる波長は徐々に低波長側へシフトしていく。このため、光軸に垂直な方向の軸から徐々に 45° まで干渉フィルター 3 4 a ~ 3 4 c を傾けることによって、図 6 (a) に示す各透過波長特性を図 6 (b) に示す透過波長特性までその波長領域を連続的にシフトさせることができる。

【0046】前記干渉フィルター 3 4 a, 3 4 b, 3 4 c を透過した各光は、前記分離用ダイクロイックミラー 3 3 a, 3 3 b, 3 3 c と同一の透過波長特性を有する集光用ダイクロイックミラー 3 3 a', 3 3 b', 3 3 c' にて反射さされて全反射ミラー 3 2 で全反射されて前記光軸 3 6 上で再び集光レンズ 3 5 にて 1 つの光束に変換されて、この光量調整装置 1 6 から次の開口絞り 3 へ出射される。

【0047】光量調整装置 1 6 から出射された光束は開口絞り 3、視野絞り 4、レンズ 5 を介して蛍光フィルターセット 6 内の励起フィルター 7 へ入射される。励起フィルター 7 は図 10 で示す各狭帯域励起光波長 λ_{EA} , λ_{EB} , λ_{EC} の光を透過する特性を有している。

【0048】したがって、前記光量調整装置 1 6 とこの励起フィルター 7 とを併用することによって得られるダイクロイックミラー 8 に入射する励起光の波長成分は図 6 (a), (b) における斜線部分となる。図 6 (a) は各干渉フィルター 3 4 a, 3 4 b, 3 4 c を光軸に垂直にした場合を示し、図 6 (b) は各干渉フィルター 3

4a, 34b, 34cを光軸に対し45°方向に傾斜させた場合を示す。

【0049】図6(a)においては、各励起波長帯域とも励起フィルター7による励起光と同等の励起光が得られるが、図6(b)では各干渉フィルター34a~34cの影響により各励起波長帯域ともカットされて、光量が減少している。さらに図6(a)と図6(b)の間の状態、つまり各干渉フィルター34a~34cの傾きを0°から45°へ徐々に増加していくと、各干渉フィルター34a~34cによる透過波長率帯はその傾斜角増加に伴って短波長側にシフトしていき、励起フィルター7の透過波長率帯との重なりは各励起波長帯域の長波長側から消滅していく。

【0050】すなわち、カットされる波長領域が徐々に多くなっていくので、励起光の光量が減少していく。よって各干渉フィルター34a~34cの傾きを任意の角度にすることでダイクロイックミラー8を介して標本11へ照射される各励起光の光量を無段階で調整することが可能となる。

【0051】ここで各励起光波長帯域の光量(強度)は夫々独立した光路に配置された干渉フィルター34a, 34b, 34cの傾きによって制御されるために、3つの狭帯域励起光波長 λ_{EA} , λ_{EB} , λ_{EC} の光の光量はそれぞれ独立して調整することができる。

【0052】つまり干渉フィルター34a, 34b, 34cの傾きをそれぞれ独立して任意の角度にすれば各波長 λ_{EA} , λ_{EB} , λ_{EC} を有する3つの各励起光の強度の比を連続的に変化させることができ、これに伴って各励起光により励起される3種類の蛍光相互間の強度比、及び各蛍光の強度の絶対値を所望とする値に調整することができる。

【0053】したがって、3種類の蛍光色素によって蛍光強度に差が生じた場合や3種類の蛍光間で褪色の速度に差が生じた場合、3種類の蛍光像の明るさのバランスが異なるが、このような場合には干渉フィルター34a~34cの傾きを変更する簡単な操作により3種類の蛍光強度の比を容易に調節でき、観察或いは写真撮影等において一つの蛍光像が明るすぎたり、或いは暗すぎたりする問題を解決することができる。

【0054】さらに、標本11に対する照明側の光路における調光であるので、前述したような励起効率の低下や標本11の劣化速度を上昇させる懸念もなくなる。以上、標本11に対する3重染色について説明したが、次に、2重染色又は4重染色以上の対応について説明する。

【0055】図4に示すように、各干渉フィルター34a~34cと、その前後の分離用及び集光用の各ダイクロイックミラー33a~33c, 33a'~33c'とをそれぞれ1個づつ含んだ構成をそれぞれ独立した単位光量調整ユニット42a~42cとしている。

【0056】したがって、単位光量調整ユニット42a~42cの組込個数を増加することによって、簡単に高機能化を図ることができる。例えば2重励起のみに対応する場合、図3において最も外側の単位光量調整ユニット42'cを取外し、光量調整装置16を2個の単位光量調整ユニット42a, 42bのみで構成すればよい。

【0057】一方、4重励起に対応する場合、図2に破線で示したダイクロイックミラー33d, 33d'および干渉フィルター34dを含む、図示しないユニット42dを取り付ければ良い。図2において最も外側の分離用ダイクロイックミラー33cを透過した長波長部分の光は新たに縫足した単位光量調整ユニット42dの分離用ダイクロイックミラー33dに導かれるため、干渉フィルター34dの対応する励起波長帯域を、光軸36から離れるに従って長波長側とし、それに対応する各ダイクロイックミラー33d, 33d'を使用することで、何重励起であろうとも対応可能となる。

【0058】単位光量調整ユニット42の取付は、図4において任意のユニット42のフランジ部59a, 59bを、光軸36に近い側の単位光量調整ユニット42の貫通孔48a, 48bへ挿入して嵌合させる。その後、前記金具46を使いユニットのビス穴57, 58にビス固定し、連結固定させる。

【0059】したがって、このような構成によれば、前述の効果に加え、将来多重染色が何重に増えようとも対応する観察システムが容易かつ簡便に実現できる。図7は本発明の他の実施例に係わる落射蛍光顕微鏡に組込まれる光量調整装置の外観図である。

【0060】この光量調整装置においては、図2の各干渉フィルター34a, 34b, 34cの代りに、各光量調整フィルターとして、それぞれニュートラル・デンシティ・フィルター(以下NDフィルターと略記する)71a~71cが交換可能に設けられている。その他の光学構成は図2に示す実施例と同じである。

【0061】このNDフィルター71a~71cは、各波長領域に亘って一定の透過率を有している。すなわち、顕微鏡本体フレーム41内には、図2に示す光軸上のコリメータレンズ31, 2個の全反射ミラー32, 32', 集光レンズ35が収納されている。そして、顕微鏡本体フレーム41におけるこの各光学部材が収納された外面に3個の直方体形状を有する単位光量調整ユニット62a, 62b, 62cが積層状に取付けられている。

【0062】単位光量調整ユニット62a内には、分離用ダイクロイックミラー33a, NDフィルター71a, 集光用ダイクロイックミラー33a'が収納されている。また、単位光量調整ユニット62b内には分離用ダイクロイックミラー33b, NDフィルター71b, 集光用ダイクロイックミラー33b'が収納されている。さらに、単位光量調整ユニット62c内には分離用

ダイクロイックミラー33c, NDフィルター71c, 集光用ダイクロイックミラー33c¹が収納されている。

【0063】単位光量調整ユニット62a, 62b, 62c内に収納された各NDフィルター71a~71cは、図示するように、フィルター枠63a~63cにて光路中に光軸と垂直な方向に支持されている。そして、このフィルター枠63a~63cには、貫通孔64a~64cを介してこの各単位光量調整ユニット42a, 42b, 42cの外部に引出すための突起部65a~65cが取付けられている。

【0064】また、各単位光量調整ユニット62a, 62b, 62cの各前面及び後面には各分離用ダイクロイックミラー33a~33cを透過した光、及び、各集光用ダイクロイックミラー33a~33c¹へ入射する光が通過する貫通孔68a, 68bが穿設されている。なお、最も外側の単位光量調整ユニット62cの前面の使用しない貫通孔68a, 68bは図示しないキャップ等で塞がれている。

【0065】そして、各単位光量調整ユニット62a, 62b, 62c相互間は固定金具56を介して固定ビス67で固定されている。このように構成された光量調整装置が組込まれた落射蛍光顕微鏡の動作を説明する。

【0066】各フィルター枠63a~63cを各単位光量調整ユニット62a~62cに装着することによって、各NDフィルター71a~71cが各分離用ダイクロイックミラー33a~33dの反射光の光路に挿入される。各NDフィルター71a~71cに入射する光は図5に示す各ダイクロイックミラー33a~33cにて選別された各狭帯域励起光波長 λ_{EA} , λ_{EB} , λ_{EC} の光を含む。各NDフィルター71a~71cはこの各狭帯域励起光波長 λ_{EA} , λ_{EB} , λ_{EC} の光を含む光の光量をそれぞれ自己が有する透過率に対応して減少させる。

【0067】したがって、この光量調整装置の各NDフィルター71a~71cと図8(a)に示す各色素A~Cに対応する狭帯域励起光波長 λ_{EA} , λ_{EB} , λ_{EC} の各光を抽出する透過波長特性を有した励起フィルター7とを組合わせた場合には、励起フィルター7からダイクロイックミラー8へ入射する前記各狭帯域励起光波長 λ_{EA} , λ_{EB} , λ_{EC} の光は、図8(b)の斜線部分に示すように、各NDフィルター71a~71cが有する透過率に従ってその各光量が制限(カット)される。

【0068】各NDフィルター71a~71cの透過率は、各NDフィルター71a~71c固有の値であるので、透過率の異なる他のNDフィルター71a~71cと交換することによって、ダイクロイックミラー8へ入射する狭帯域励起光波長 λ_{EA} , λ_{EB} , λ_{EC} の各光の光量を任意に調整可能となる。

【0069】よって、ダイクロイックミラー8で反射されて、標本11へ照射される各波長 λ_{EA} , λ_{EB} , λ_{EC} の

励起光量を任意に設定でき、この励起光に励起して発生する3種類の蛍光相互間の光量比、及び各蛍光の絶対値を所望の値に調整することが可能である。

【0070】したがって、このような実施例の構成によれば、3種類の蛍光色素によって蛍光強度に差が生じた場合や、3種類の蛍光間で褪色の速度に差が生じた場合、3種類の蛍光像の明るさのバランスが異なる場合、単位光量調整ユニット62a~62cの各NDフィルター71a~71cを交換するだけの簡便な操作により3種類の蛍光強度の比を容易に調整できる。

【0071】その結果、観察や写真撮影等において、各蛍光像のうちのいずれかの蛍光像が明るすぎたり、暗すぎたりする問題を簡単に解消できる。しかも、標本11に対する照明光の調光であるので、前述したような励起効率が低下する懸念もなく、標本11に対する過大照射に起因する標本11の劣化を未然に防止できる。

【0072】さらに、NDフィルター71a~71cは安価であり、一般に市販されているので、簡単に入手でき、光量調整装置の製造費が特に大幅に上昇することはない。

【0073】なお、このNDフィルター71a~71cを用いた光量調整装置であっても、先の実施例の光量調整装置と同様に、標本11に対する多重染色数の増減に簡単に対応できる。

【0074】

【発明の効果】以上説明したように本発明の落射蛍光顕微鏡によれば、落射照明用光源からダイクロイックミラーまでの光路に、各狭帯域励起光波長の光の光量をそれぞれ個別に調整する光量調整装置が介挿されている。したがって、多重染色蛍光標本においてこの標本から発する各蛍光色素の励起光量をそれぞれ独立して簡単に調整できるので、各蛍光色素毎の蛍光強度の違い及び褪色速度の違いや観察者の好みに応じて多重染色の蛍光像の明るさの比を変えることができ、観察又は写真撮影等に際して蛍光色素の違いによる蛍光像の明るさの相違を確実に補正でき、観察しやすい蛍光像を得ることができる。

【0075】また、照射光側で励起光を調整するので、標本より発し観察光路に導かれる蛍光は従来顕微鏡のように調節フィルターにより強度が弱められることがないので、蛍光強度を上げるために、通常より多くの励起光を標本に照射する必要がなく、標本に対して損傷を与えることがない。また将来的に多重染色の同期観察の数が増加したり、減少した場合においても、単位光量調整ユニットを増減することによって簡単に対応できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の一実施例に係わる落射蛍光顕微鏡の概略構成を示す光学系構成図。

【図2】 同実施例顕微鏡に組込まれた光量調整装置の概略構成を示す光学系構成図。

【図3】 同光量調整装置の外観図。

14

における蛍光フィルターセットの各フィルタとダイクロイックミラーの各透過波長特性図。

【符号の説明】

1…光源、6…蛍光フィルターセット、7…励起フィルター、8…ダイクロイックミラー、9…吸収フィルター、10…ステージ、11…標本、12…対物レンズ、13…ビームスプリッター、16…光量調整装置、32、32'…全反射ミラー、33a、33b、33c…分離用ダイクロイックミラー、33a'、33b'、33c'…集光用ダイクロイックミラー、34a、34b、34c…干渉フィルター、42a、42b、42c、62a、62b、62c…単位光量調整ユニット、71a、71b、71c…NDフィルター。

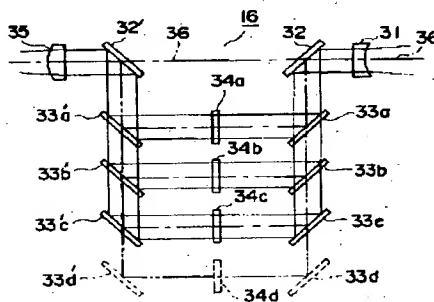
13…ビームスプリッター、16…光束調整装置、32、32'…全反射ミラー、33a、33b、33c…分離用ダイクロイックミラー、33a'、33b'、33c'…集光用ダイクロイックミラー、34a、34b、34c…干渉フィルター、42a、42b、42c、62a、62b、62c…単位光束調整ユニット、71a、71b、71c…NDフィルター。

13…ビームスプリッター、16…光束調整装置、32、32'…全反射ミラー、33a、33b、33c…分離用ダイクロイックミラー、33a'、33b'、33c'…集光用ダイクロイックミラー、34a、34b、34c…干渉フィルター、42a、42b、42c、62a、62b、62c…単位光束調整ユニット、71a、71b、71c…NDフィルター。

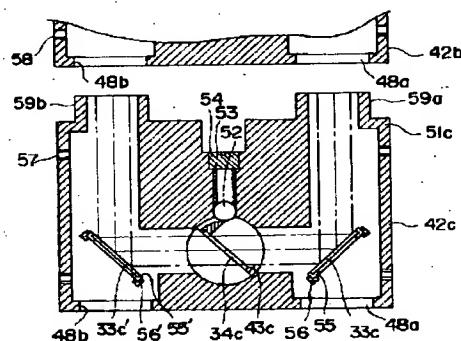
13…ビームスプリッター、16…光束調整装置、32、32'…全反射ミラー、33a、33b、33c…分離用ダイクロイックミラー、33a'、33b'、33c'…集光用ダイクロイックミラー、34a、34b、34c…干渉フィルター、42a、42b、42c、62a、62b、62c…単位光束調整ユニット、71a、71b、71c…NDフィルター。

13…ビームスプリッター、16…光束調整装置、32、32'…全反射ミラー、33a、33b、33c…分離用ダイクロイックミラー、33a'、33b'、33c'…集光用ダイクロイックミラー、34a、34b、34c…干渉フィルター、42a、42b、42c、62a、62b、62c…単位光束調整ユニット、71a、71b、71c…NDフィルター。

【图2】



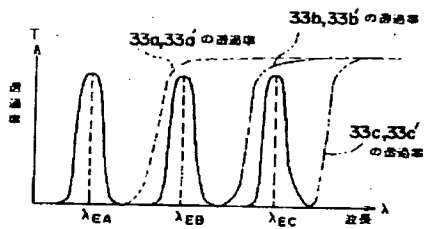
【図4】



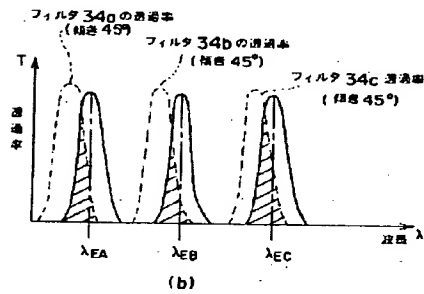
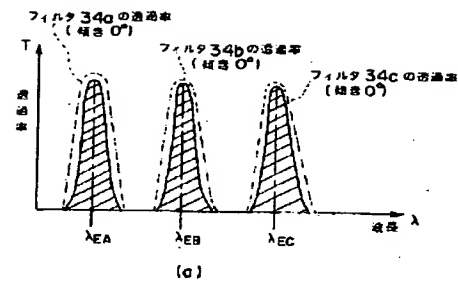
(9)

特開平6-331894

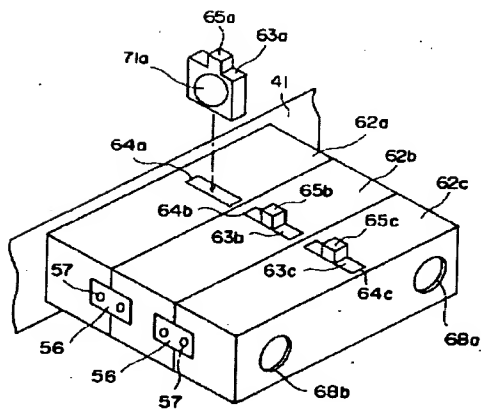
【図5】



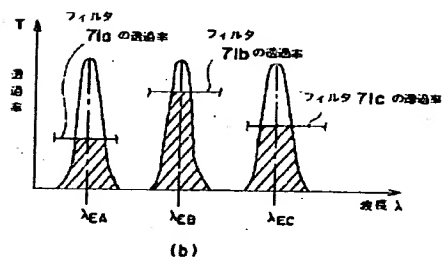
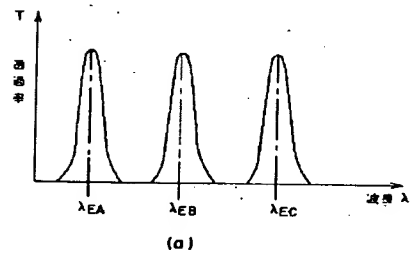
【図6】



【図7】



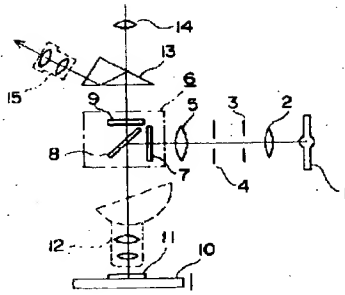
【図8】



(10)

特開平6-331894

【図9】



【図10】

